

## 黄色ブドウ球菌の二成分毒素 ヘモリジン並びにロイコシジンの血球崩壊機構に関する研究

著者	菅原 典子
号	657
発行年	2000
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16680">http://hdl.handle.net/10097/16680</a>

氏 名(本籍)	菅 原 典 子
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 6 5 7 号
学位授与年月日	平 成 13 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)
学 位 論 文 題 目	黄色ブドウ球菌の二成分毒素 $\gamma$ ヘモリジン並びにロイコ シジンの血球崩壊機構に関する研究
論文審査委員	(主 査) 教 授 神 尾 好 是 教 授 勝 亦 瞭 一 教 授 五 味 勝 也

# 論文内容要旨

## I. 序論

黄色ブドウ球菌は、ヒトの常在菌として知られているが、ニキビ、トビヒなどの皮膚疾患や日和見感染症の起因菌としても知られている。また家畜においても乳牛の乳房炎の主要な起因菌として、あるいは食中毒の原因菌として畜産業、食品産業に甚大な被害を与え続けている。本博士論文では、黄色ブドウ球菌感染を理解して新規治療法の開発への糸口を見出すために、宿主の生体防御機構の破壊を起こして菌の感染成立を促進する細胞崩壊毒素、特に、二成分性の赤血球崩壊毒素 $\gamma$ ヘモリジン、及び、白血球崩壊毒素ロイコシジンの作用機構に関する研究をおこなった。 $\gamma$ ヘモリジンは Hlg1 成分と Hlg2 成分から成り、ロイコシジンは LukF 成分と LukS 成分から成る。両成分は独立した水可溶性タンパク質として菌体から分泌される。今日まで、Hlg1 成分と LukF 成分は同一遺伝子産物である事実が明らかにされている。本博士論文においては、 $\gamma$ ヘモリジン並びにロイコシジンの血球崩壊作用の分子の実体を解析し、毒素の二成分が赤血球膜上で分子集合してリング状の膜孔複合体を形成して溶血を起こす機構を明かにした。さらに、毒素が形成する膜孔複合体の微細構造を解析して、毒素の二成分が交互に配列してヘテロヘプタマーを形成することを明らかにした。

## II. $\gamma$ ヘモリジンの膜孔 (membrane pore) 形成と膜孔複合体の分子構築

### II-1. $\gamma$ ヘモリジンの膜孔形成と膜孔の内径測定

$\gamma$ ヘモリジンをヒト赤血球に作用させ、位相差顕微鏡で経時的に観察すると、赤血球は中央が窪んだ円盤状の正常な形から、膨潤して球状になり、その後ヘモグロビンを放出して赤血球ゴーストになる過程が観察された (図1-A)。また、血球の膨潤速度とほぼ同じ速度で血球内のカリウムイオンが流出し、その後ヘモグロビンの流出が起きた (図1-B)。これらの結果から $\gamma$ ヘモリジンは赤血球膜にカリウムイオンの水和直径よりも大きく、ヘモグロビンの水和直径よりも小さい、親水性の膜孔 (membrane pore) を形成すると推定された。この膜孔の大きさを測定するために、個々の分子直径を持つ球状の非電解質物質であるポリエチレングリコールを添加した条件下で、 $\gamma$ ヘモリジンによる溶血活性を測定した。 $\gamma$ ヘモリジンが赤血球膜に membrane pore を形成し、この pore の内径が赤血球内のヘモグロビンの分子直径よりも小さい場合、ヘモグロビンは細胞の外側方向へ 33 mOsm の浸透圧を与える。

各種大きさのポリエチレングリコールをヘモグロビンの浸透圧に拮抗する 44 mOsm の浸透圧を与える濃度で赤血球外液に添加した。ポリエチレングリコールの分子直径が pore の内径より大きい場合には、ポリエチレングリコールは pore を通過できないため、ヘモグロビンに拮抗する浸透圧を与えることができ、溶血は起こらない。一方、ポリエチレングリコールの分子直径が pore の内径より小さい場合には、ポリエチレングリコールは pore を自由に通過できるため、ヘモグロビンに拮抗する浸透圧を与えることができない。その結果、赤血球内外の浸透圧平衡が崩れて溶血が起こる。平均分子量 600 以下のポリエチレングリコールを添加した場合には、ポリエチレングリコールを添加しないコントロールとほぼ同様の溶血曲線が見られた。分子直径 2.1 nm のポリエチレングリコール 1500 を添加した場合に活性はほぼ完全に阻害されたが、高濃度の毒素を添加した場合にわずかに活性が検出された。分子直径 2.4 nm のポリエチレングリコール 2000 を添加した場合には高濃度の毒素を添加しても活性は完全に阻害された(図2)。従って、 $\gamma$ ヘモリジンはヒト赤血球膜上に実効内径 2.1 ~ 2.4 nm の membrane pore を形成すると推定した。

## II-2. $\gamma$ ヘモリジンが形成する膜孔 ( membrane pore ) の分子の実体の解明

II-1 の実験で  $\gamma$ ヘモリジンは赤血球膜に membrane pore を形成すると推定された。次に membrane pore の分子の実体に迫った。始めに透過型電子顕微鏡による形態学的解析を行った。 $\gamma$ ヘモリジンを用いた赤血球膜をリンタングステン酸で negative 染色し、透過型電子顕微鏡で観察すると、膜上に内径約 3 nm、外径約 9 nm のリング状構造体が観察された(図3-A)。 $\gamma$ ヘモリジンを用いない赤血球膜、または毒素の一方の成分のみを用いた場合には、このようなリング状構造体は観察されなかった(図3-B)。従って、このリング状構造体が膜孔の本体であること、また Hlg1、Hlg2 の二成分から成ると考えられた。

次に membrane pore の分子の実体について、生化学的手法を用いて解析した。ヒト赤血球に毒素を用いさせ、2% SDS で 20℃または 100℃で可溶化した。その後、SDS-PAGE で分画した後に Westernblotting / Immunostaining を行った。その結果、20℃で可溶化した場合に、抗 Hlg1 抗体及び抗 Hlg2 抗体で特異的に染色される 200 ~ 300 kDa のバンドが検出された。このバンドは 100℃で可溶化すると Hlg1 と Hlg2 のモノマーのバンドに分離した。従って、 $\gamma$ ヘモリジンの二成分は赤血球膜上で 200 ~

300 kDa の複合体を形成することが明かとなった。

この複合体について更に詳しく解析するために、複合体の赤血球膜からの単離を試みた。毒素を作用させた赤血球膜を 2 % SDS で 20℃ で可溶化し、シヨ糖密度勾配遠心法で分画した。その結果、赤血球膜タンパク質を含まない画分中 (図4-A : Fr.) に、抗 Hlg1 抗体及び抗 Hlg2 抗体で特異的に染色される 200 ~ 300 kDa のバンドが検出された。これらの画分を回収し再度シヨ糖密度勾配遠心法で分画し、SDS-PAGE で解析すると、195 kDa の大きさに最も濃いバンドが検出された。この画分を SDS 存在下で 100 °C、5 分間の熱処理を行うと、Hlg1、Hlg2 のモノマーのバンドに解離した (図4-B)。2 本のモノマーのバンドの濃さをデンストメーターで測定、比較すると、ほぼ 1 : 1 であった (図4-C)。この画分を電子顕微鏡で観察すると、毒素を作用させた赤血球膜上で観察されたものと同様の内径約 3 nm、外径約 9 nm のリング状構造体が観察された (図5-A)。この画分中の 195 kDa のバンド、約 300 kDa のバンド、約 300 kDa 以上の大きさのブロードなバンドをそれぞれアクリルアミドゲルから抽出し、電子顕微鏡で観察すると、195 kDa のバンドはシングルリング、約 300 kDa のバンドは 2 個 ~ 3 個のリング、約 300 kDa 以上の大きさのバンドは十数個のリングが集まった状態が観察された (図5-B)。従って、1 個のリング状構造体の大きさは 195 kDa であることが明らかとなった。以上の結果から、 $\gamma$ ヘモリジンの二成分はヒト赤血球膜上でモル比 1 : 1 で集合して、大きさが 195 kDa で内径約 3 nm、外径約 9 nm のリング状膜孔複合体を形成し、このリング状膜孔複合体が実効内径 2.1 ~ 2.4 nm の membrane pore として作動し、溶血を引き起こすと推定した。

次に、1 個のリングを構成する正確なモノマー分子の数、また 1 個のリング状構造体に含まれる分子種の同定、およびリング内の分子配列について解析した。

### II-3. $\gamma$ ヘモリジンが形成するリング状膜孔複合体の構造解析

#### (1) 透過型電子顕微鏡および画像解析装置による形態学的解析

リング状構造体を形成するモノマー分子数の測定は、透過型電子顕微鏡を用いて形態学的に行った。ヒト赤血球膜から単離したリング状の毒素複合体をリンタングステン酸でネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察した。毒素複合体の高精細な電子顕微鏡像を Leica 社製の画像解析装置 Q600 で解析した結果、リング状構造体は 7 個のモノマー分子から成ることが明かとなった (図6)。

## (2) 免疫沈降法によるリングを構成する分子種の同定

赤血球膜から単離したリング状構造体に抗 Hlg1 抗体または抗 Hlg2 抗体を作用させ、4℃で一晩反応させた。生じた沈澱画分を SDS 存在下で 100℃、5 分間熱処理し、SDS-PAGE を行った。その結果、いずれの抗体を使用した場合でも、沈降物中に Hlg1 と Hlg2 がモル比 1 : 1 で含まれていた (図7)。この結果から、1 個のリング状構造体中には Hlg1 と Hlg2 の両成分が含まれていることが明らかとなった。

## (3) 分子架橋によるリング内における分子配列の決定

赤血球膜から単離したリング状構造体をグルタルアルデヒドで処理し、隣接するモノマー分子同士を架橋した。反応液を SDS で 100℃、5 分間熱処理するとダイマーに相当する 62 kDa、64 kDa、66 kDa の大きさの 3 本のバンドが検出された。これらのバンドのうち、62 kDa のバンドは抗 Hlg2 抗体のみで、66 kDa のバンドは抗 Hlg1 抗体のみで染色され、64 kDa のバンドは抗 Hlg1 抗体と抗 Hlg2 抗体で染色された (図8-A)。各バンドの N 末シーケンスを行った結果、62 kDa のバンドは Hlg2 の N 末端と一致し、66 kDa のバンドは Hlg1 の N 末端と一致し、64 kDa のバンドは Hlg1 と Hlg2 の N 末端が検出され、二成分間の各アミノ酸のモル比はほぼ 1 : 1 であった (図8-B)。従って 66 kDa のタンパク質は Hlg1 のダイマー、62 kDa のバンドは Hlg2 のダイマー、また 64 kDa のバンドは Hlg1 と Hlg2 から成るダイマーと考えられた。62 kDa、64 kDa、66 kDa のバンドの生成比はほぼ 1 : 10 : 1 であった (図8-C)。この比率から、リング内で両成分は主に交互に配置され、部分的に同一成分が並ぶと推測された。

## (4) 電子顕微鏡によるリング内における分子配列の可視化

リング中での分子配列の形式を電子顕微鏡で直接観察することを試みた。Hlg1 成分の 3 次構造から N 末端は膜から突き出た部分にあり、かつリングの中心から外側を向いていると予測された。従って、N 末端に グルタチオン S トランスフェラーゼ (glutathione S-transferase, GST) を融合させた Hlg1 は 電子顕微鏡で識別可能と考えられた。GST 融合 Hlg1 と wild type Hlg2 から形成されるリング状構造体を赤血球膜から単離して電子顕微鏡で観察した結果、直径約 3 nm の Hlg1 分子に GST 分子が結合している様子が観察された。二成分が 3 : 4 または 4 : 3 の割合で交互に並んで

いるモデルを考えた場合に、電子顕微鏡写真の GST 融合 Hlg1 の位置とモデル上での位置が一致した (図9)。

この結果と II-(3) の結果から、 $\gamma$ ヘモリジンが形成するリング状構造体は各成分が 4:3 または 3:4 の割合で交互にならんで集合したヘテロヘプタマー構造をとることが明らかとなった。

#### II-4. $\gamma$ ヘモリジンが形成するリング状構造体のクラスター化と溶血反応

$\gamma$ ヘモリジンが形成するリング状構造体は赤血球膜上で数個～数十個集まってクラスター化する傾向が見られた。このクラスターの周囲の膜は大きく破壊されていた (図10)。この観察からクラスター形成により周囲の膜が破壊され、溶血が促進されるのではないかと推定した。そこで、クラスター形成と溶血活性との関わりについて検討した。ヒト赤血球に $\gamma$ ヘモリジンを作用させた後、赤血球を遠心洗浄し、一定量の毒素が結合した赤血球を集めた。反応温度を 37℃にシフトアップさせ、溶血活性とリング形成ならびにクラスター形成を経時的に測定した。リング形成とクラスター形成は電子顕微鏡下で直接観察、計測し、溶血活性は位相差顕微鏡で膨潤から溶血に至る状態を直接観察した。その結果、毒素を作用させた赤血球膜上にはリングが形成されるが、始めは単独で存在する。このリング形成に伴い、赤血球細胞の膨潤が起こった。その後単独で存在するリングの割合は減少し、替わってリングのクラスター化が進んだ。このリングのクラスター化に伴い、溶血反応が促進されることが明らかとなった (図11)。

### III. ロイコシジンの膜孔 (membrane pore) 形成

#### III-1. ロイコシジンがウサギ赤血球膜に形成する膜孔の内径測定

ブドウ球菌のロイコシジンは白血球に作用して、細胞内のイオンの流出、及び細胞の膨潤を引き起こすことが既に明らかにされていた。このことからロイコシジンは白血球の細胞膜に membrane pore を形成し、白血球崩壊の引き金を引くと考えられていたが、その pore の大きさ、及び分子の実体は不明のままであった。そこで、ロイコシジンがヒト赤血球には作用しないけれどもウサギ赤血球には作用する性質を利用して、ロイコシジンが形成する membrane pore の大きさを測定した。 $\gamma$ ヘモリジンと同様に各種大きさのポリエチレングリコール存在下で、ロイコシジンのウサギ赤血球

に対する溶血活性を測定した。その結果、分子直径 1.9 nm のポリエチレングリコール 1000 を添加した場合に、活性が 1/2 程度に阻害され、分子直径 2.1 nm のポリエチレングリコール 1500 を添加した場合には活性は完全に阻害された（図12）。従って、ロイコシジンはウサギ赤血球膜に実効内径 1.9~2.1 nm の membrane pore を形成すると推定した。

### III-2. ロイコシジンがヒト白血球及びウサギ赤血球に形成する膜孔の分子の実体

ウサギ赤血球、並びにヒト白血球にロイコシジンを作用させた後に、細胞膜を分離してリンタングステン酸でネガティブ染色した。この膜標品を透過型電子顕微鏡で観察すると、いずれの細胞膜上にも内径約 3 nm、外径約 9 nm のリング状構造体が観察された（図13-A, B）。ウサギ赤血球膜からリング状構造体を単離し、SDS-PAGE で解析すると、140 kDa、195 kDa、300 kDa 以上の高分子バンドが検出され、これらのバンドは SDS 存在下、100℃、5分間の熱処理により LukF、LukS のモノマーのバンドに解離し、両者のモル比は 1:1 であった（図14-A, B）。この画分中には内径 3 nm、外径 9 nm のリング状構造体が観察された（図14-C）。各バンドをゲルから抽出して電子顕微鏡で観察したところ、195 kDa のバンドには単独で存在するリングが、300 kDa 以上のバンドには 2~数個のリングの集まったものが観察された。また 140 kDa のバンドにはリングは観察されなかった。従って、ロイコシジンが形成するリング状構造体 1 個の大きさは 195 kDa であることが明かとなった。これら 3 本のバンドを熱処理すると LukF、LukS のモノマーのバンドがモル比 1:1 で検出されることから、140 kDa のバンドは各成分をモル比 1:1 で含むリングの分解物、あるいは中間体と考えられる。また同様にして白血球の細胞膜からも、内径 3 nm、外径 9 nm のリング状構造体が単離された（図15）。最近、成谷らにより、ロイコシジンの白血球崩壊活性には LukS 成分のリン酸化が必要であることが明らかにされた。従って、ロイコシジンの二成分はウサギ赤血球膜、及びヒト白血球の細胞膜上で内径 3 nm、外径 9 nm のリング状構造体を形成し、このリング状構造体が親水性の膜孔として作用して細胞の膨潤を引き起こし、ウサギ赤血球の溶血、またヒト白血球の場合には LukS 成分のリン酸化を経て溶血を引き起こす考えられる。



#### IV. 結論

本博士論文により以下のことが明らかとなった。

- (1) 黄色ブドウ球菌 $\gamma$ ヘモリジンの二成分、Hlg1 (= LukF) 及び Hlg2 はヒト及びウサギ赤血球膜上で内径 3 nm、外径 9 nm のリング状の毒素複合体を形成する。
- (2)  $\gamma$ ヘモリジンのリング状毒素複合体は、各成分が 3 : 4 または 4 : 3 の割合で交互に並んで集合したヘテロヘプタマー構造をとる。
- (3)  $\gamma$ ヘモリジンのリング状ヘテロヘプタマー毒素複合体は、実効内径 2.1 ~ 2.4 nm の膜孔(membrane pore)として作動して、赤血球の膨潤 及び 溶血を引き起こし、更にクラスター化して溶血を促進する。
- (4) ロイコシジンの二成分、LukF 及び LukS は ヒト白血球 及び ウサギ赤血球膜上で内径 3 nm、外径 9 nm のリング状の毒素複合体を形成する。このリング状複合体は実効内径 1.9 ~ 2.1 nm の膜孔として作動して、ウサギ赤血球の溶血、及びヒト白血球の膨潤を引き起こす。

### 原著論文

1. Noriko SUGAWARA, Toshio TOMITA, and Yoshiyuki KAMIO (1997)  
Assembly of Staphylococcus aureus  $\gamma$ -hemolysin into a pore-forming ring-shaped complex on the surface of human erythrocytes,  
FEBS Lett. 410, 333-337.
2. Noriko SUGAWARA, Toshio TOMITA, and Yoshiyuki KAMIO (1999)  
Assembly of Staphylococcus aureus leukocidin into a pore-forming ring-shaped oligomer on human polymorphonuclear leukocytes and rabbit erythrocytes, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 63 (5), 884-891.
3. Noriko SUGAWARA, Toshio TOMITA, and Yoshiyuki KAMIO  
Heteroheptameric transmembrane pore of the bi-component staphylococcal  $\gamma$ -hemolysin, manuscript in preparation.
4. Noriko SUGAWARA, Toshio TOMITA, and Yoshiyuki KAMIO  
Facilitated hemolysis by the cluster of membrane pore complexes of the bi-component staphylococcal  $\gamma$ -hemolysin, manuscript in preparation.

### 參考論文

1. Kenji YOKOTA, Noriko SUGAWARA, Toshio TOMITA, and Yoshiyuki KAMIO (1998)  
Further Study on the two Pivotal Parts of Hlg2 for the Full Hemolytic Activity of Staphylococcal  $\gamma$ -hemolysin  
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 62 (9), 1745-1750

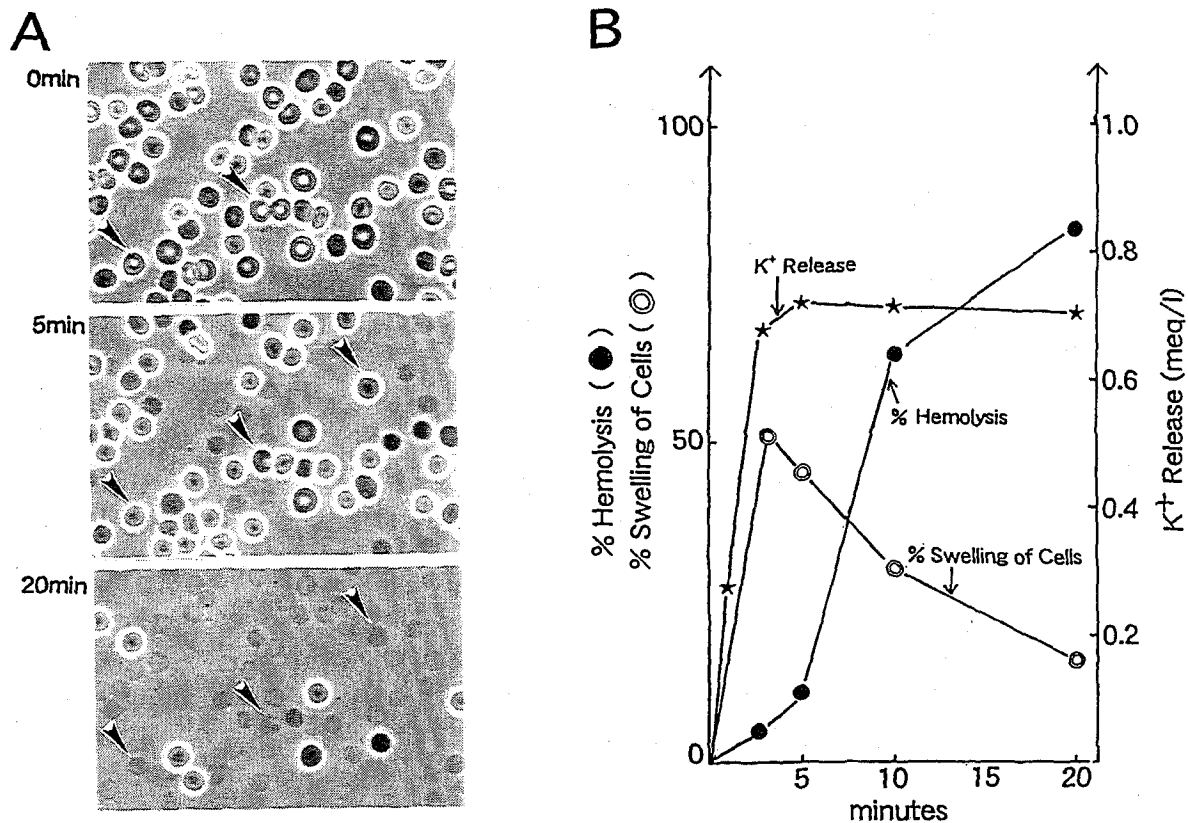


図1 A.  $\gamma$ ヘモリジンを作用させた時の赤血球の形態変化  
 B.  $\gamma$ ヘモリジンを作用させた赤血球の膨潤及び溶血に伴うカリウムイオン及びヘモグロビンの流出

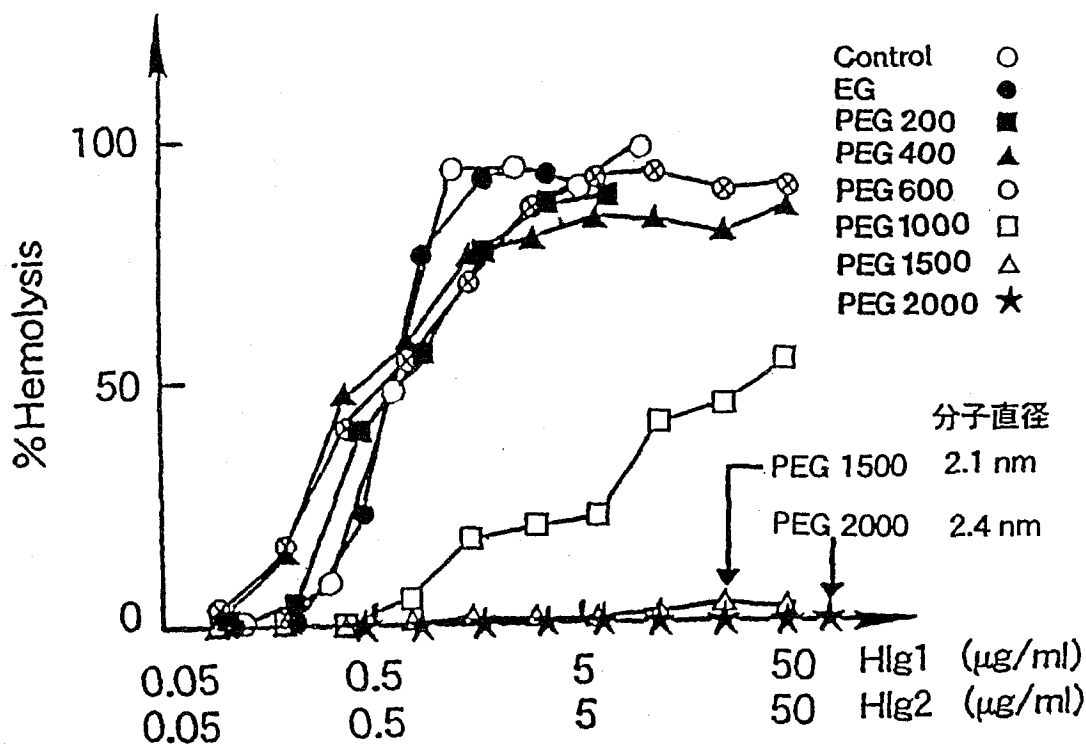


図2 各種ポリエチレングリコール存在下での $\gamma$ ヘモリジンによる溶血活性の測定  
 PEG 1500 存在下ではわずかに活性が検出されたが、PEG 2000 存在下では活性が完全に阻害された。

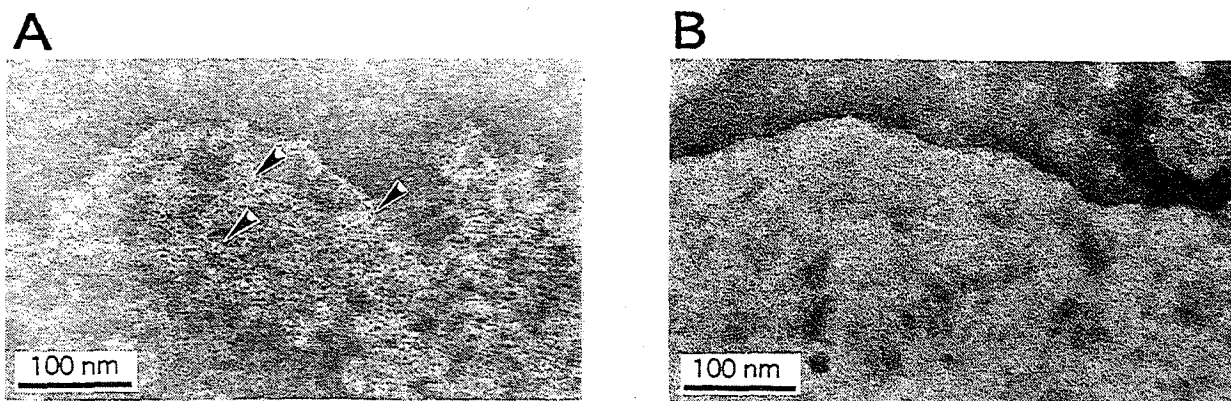


図3  $\gamma$ ヘモリジンを作用させた赤血球膜の透過型電子顕微鏡写真

A. Hlg1 及び Hlg2 を作用させた場合 B. 毒素を作用させていない場合  
A では内径約 3 nm、外径約 9 nm のリング状構造体（矢印）が観察された。

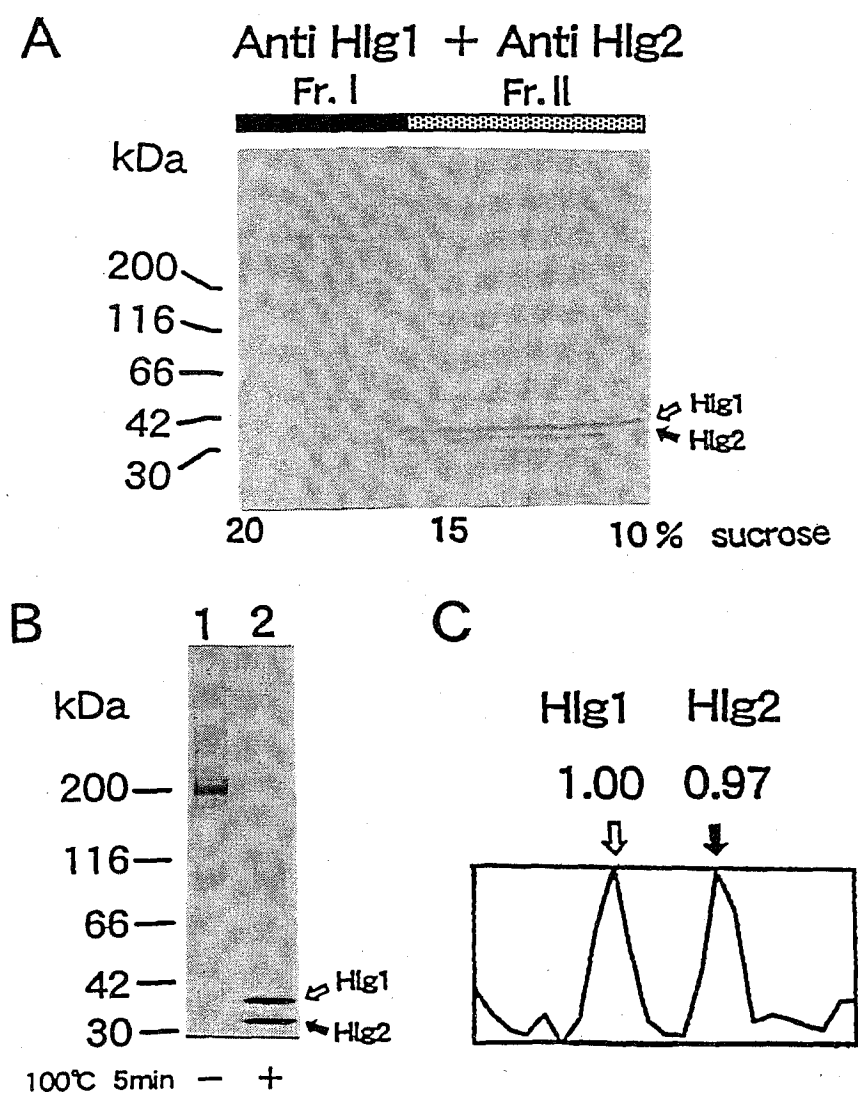


図4  $\gamma$ ヘモリジンを作用させた赤血球膜からリング状構造体の単離

A. 各シヨ糖画分の免疫染色による解析  
（Fr. I: 複合体画分、Fr. II: 膜タンパク質、及び毒素モノマー画分）  
B. 単離した複合体画分の SDS-PAGE による解析  
C. B - Lane 2 のデンシトメトリー（数値は面積比）

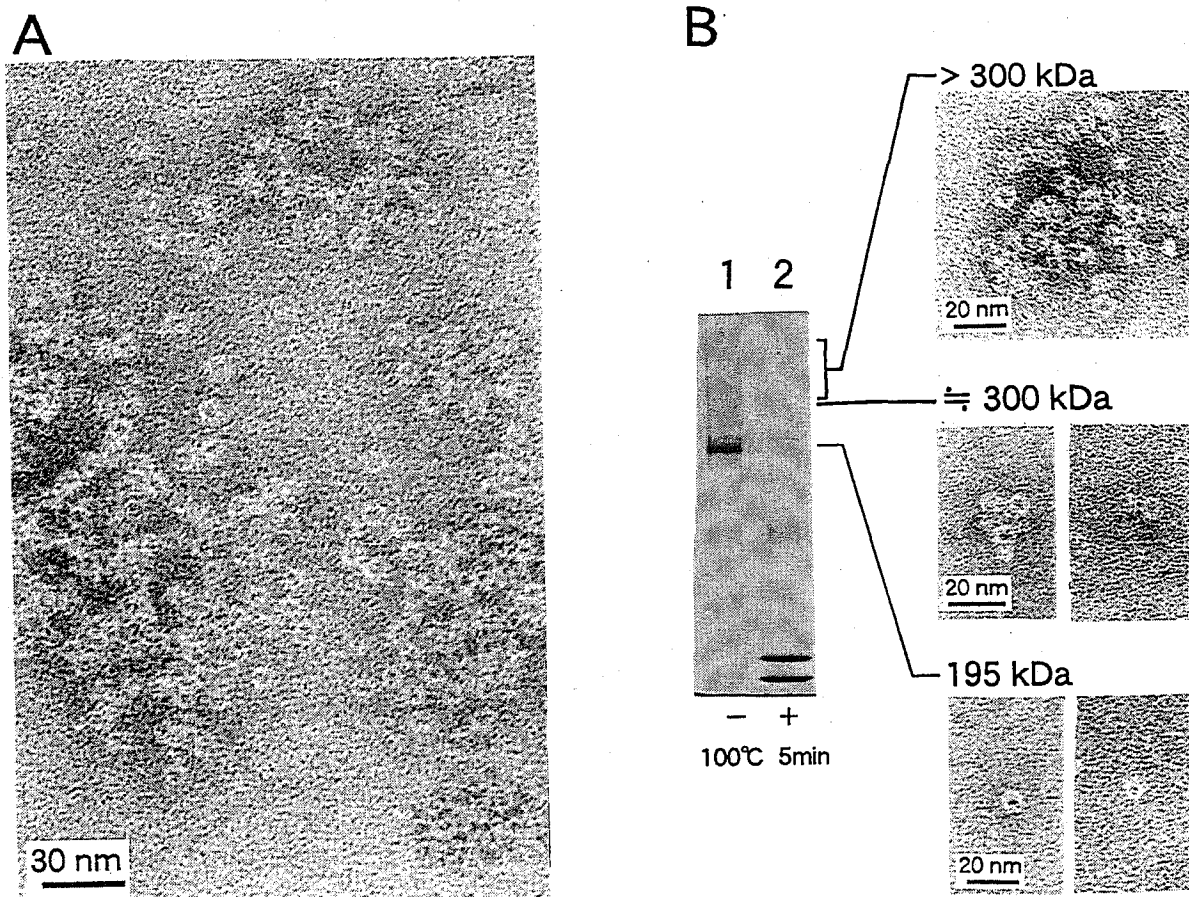


図5 A. 単離したリング状構造体の電子顕微鏡写真  
B. アクリルアミドゲルから抽出した各バンドの電子顕微鏡写真

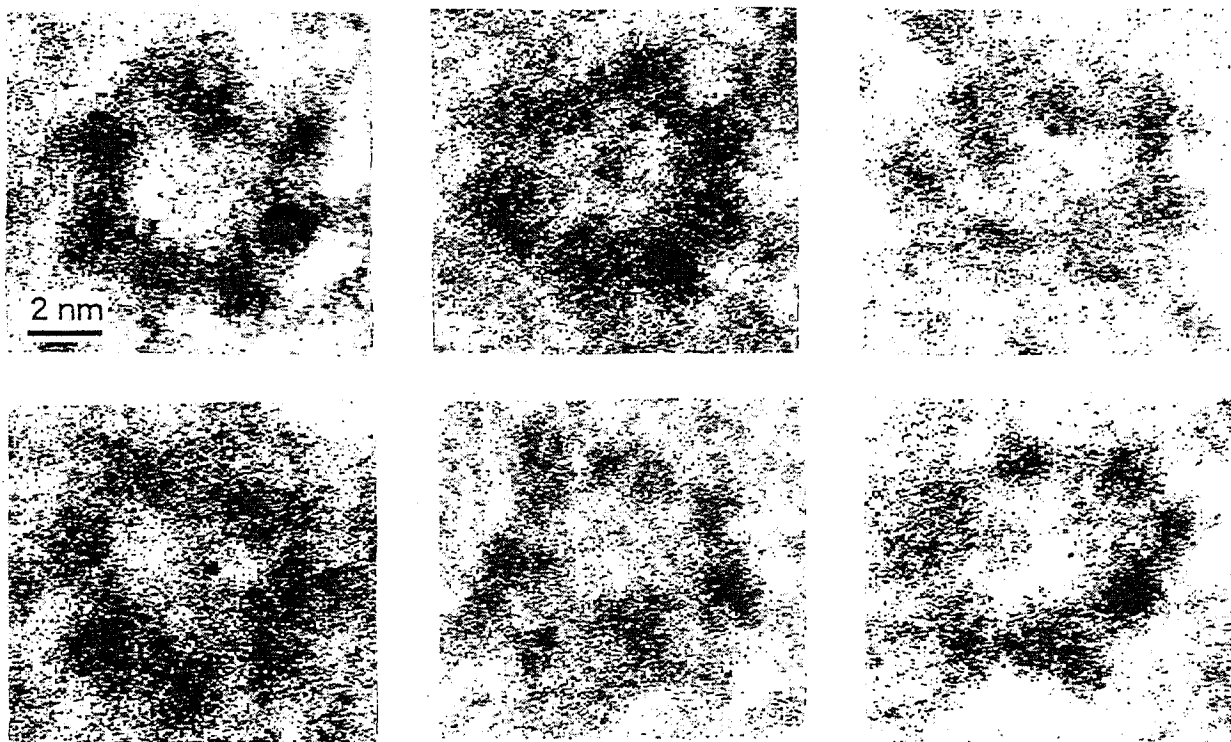


図6 リング状構造体の高精細な電子顕微鏡像

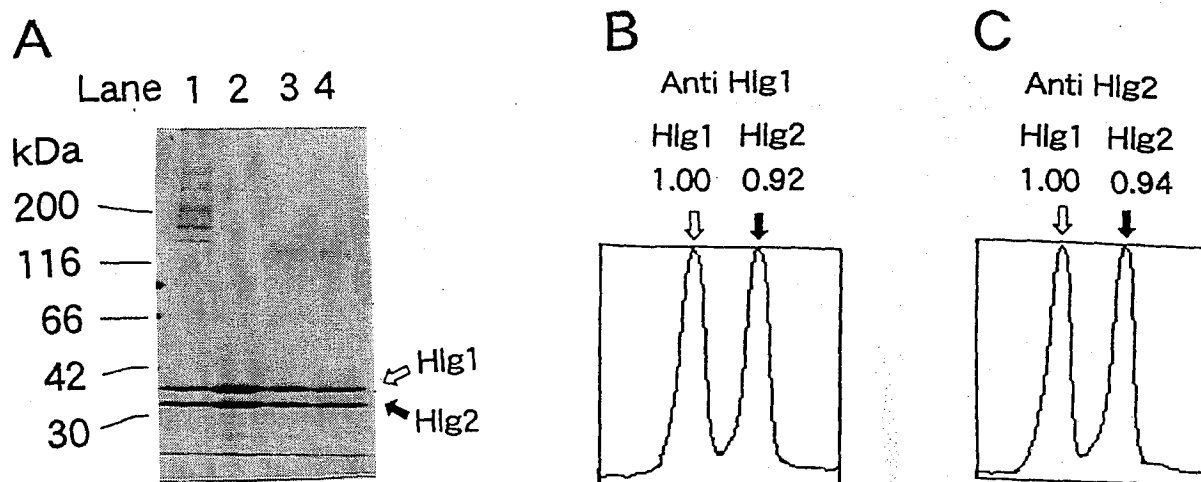


図7 免疫沈降法によるリング状構造体構成成分の同定

- A. SDS-PAGE / CBB stain の結果 Lane 1 : 赤血球膜から単離した $\gamma$ ヘモリジン複合体  
Lane 2 :  $\gamma$ ヘモリジン複合体を100℃、5分間熱処理したもの  
Lane 3 :  $\gamma$ ヘモリジン複合体 + 抗 Hlg1 抗体、沈澱を100℃、5分間熱処理したもの  
Lane 4 :  $\gamma$ ヘモリジン複合体 + 抗 Hlg2 抗体、沈澱を100℃、5分間熱処理したもの  
B. Lane 3 のデンストメトリー (数値は面積比)  
C. Lane 4 のデンストメトリー (数値は面積比)

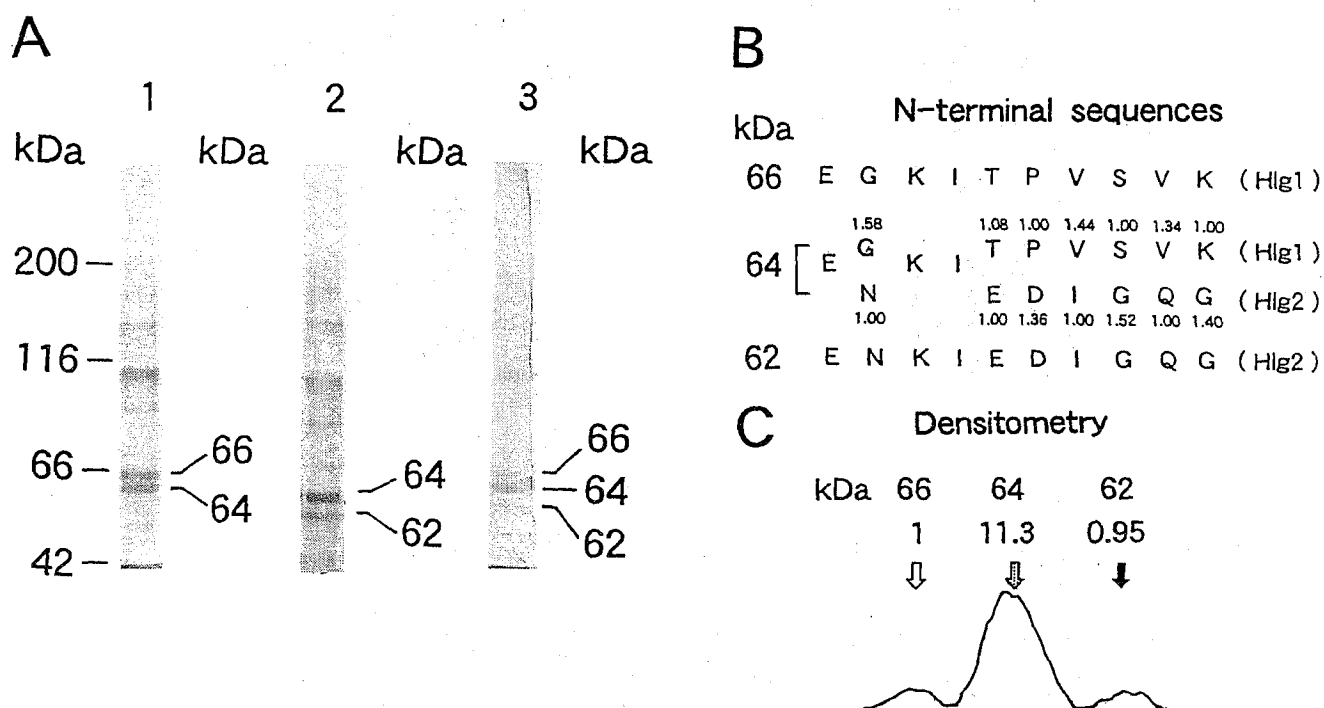


図8 グルタルアルデヒドによるリング状構造体中の隣接するモノマー分子間架橋

- A. Lane1 : 抗 Hlg1 抗体による免疫染色 Lane 2 : 抗 Hlg2 抗体による免疫染色  
Lane 3 : CBB 染色  
B. 62 kDa、64 kDa、66 kDa のバンドの N 末端アミノ酸配列  
(アミノ酸配列の上下に示した数値はモル比)  
C. A - Lane 3 のデンストメトリー (数値は面積比)

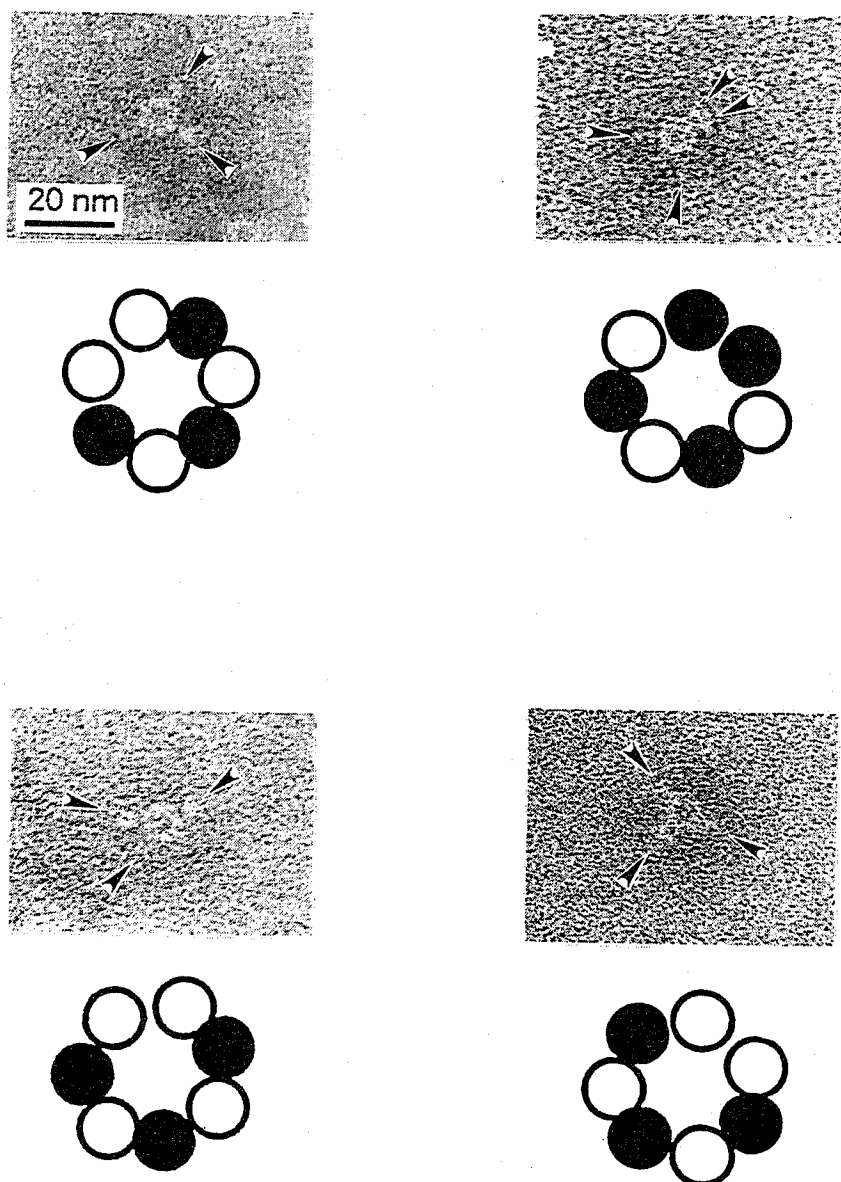


図 9 電子顕微鏡によるリング内における分子配列の可視化

Hlg1-GST 及び wild type Hlg2 が形成するリング状構造体をヒト赤血球膜から単離して電子顕微鏡観察した (矢印で示した箇所が Hlg1-GST)。

各写真下の図は各リングの模式図。黒丸が Hlg1-GST。リング内で両成分が交互に並ぶ場合に、写真矢印と模式図黒丸の位置が一致する。

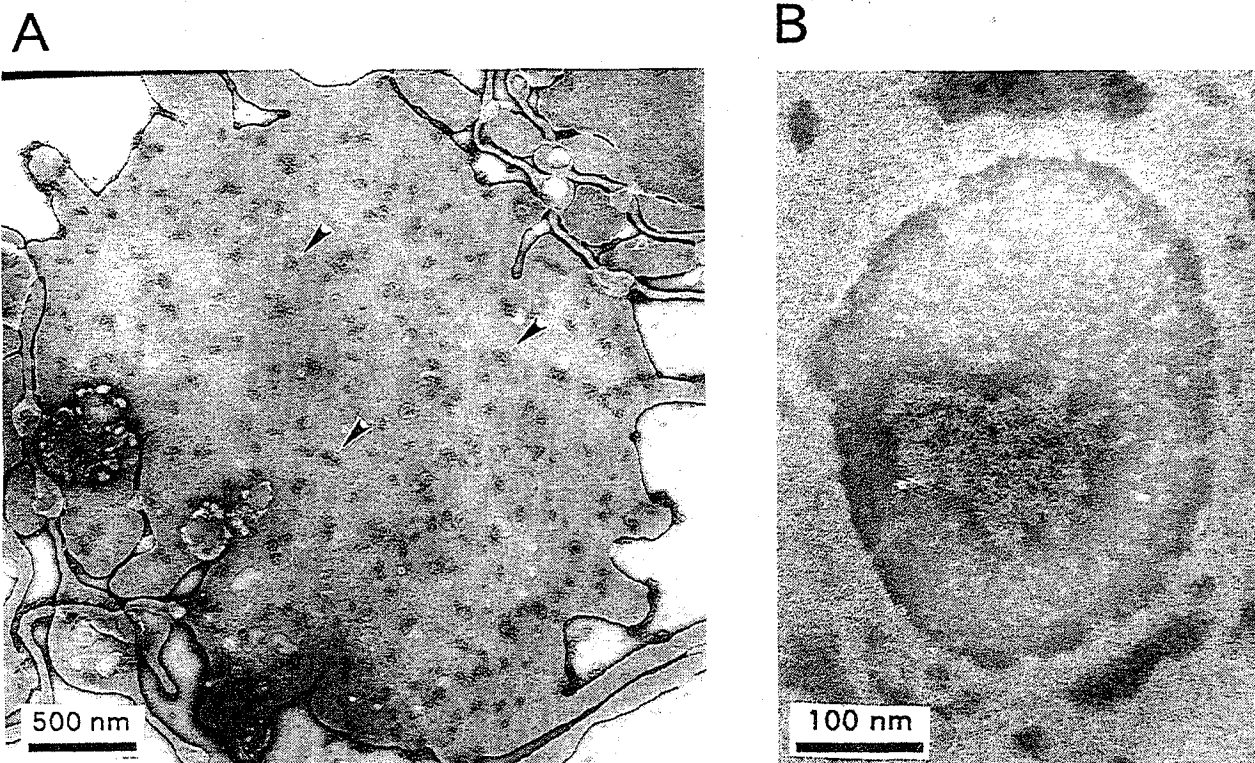


図10 A.  $\gamma$ ヘモリジンを作用させた赤血球膜上で観察されたリング状構造体のクラスター(矢印)  
B. Aで示したクラスターの拡大図

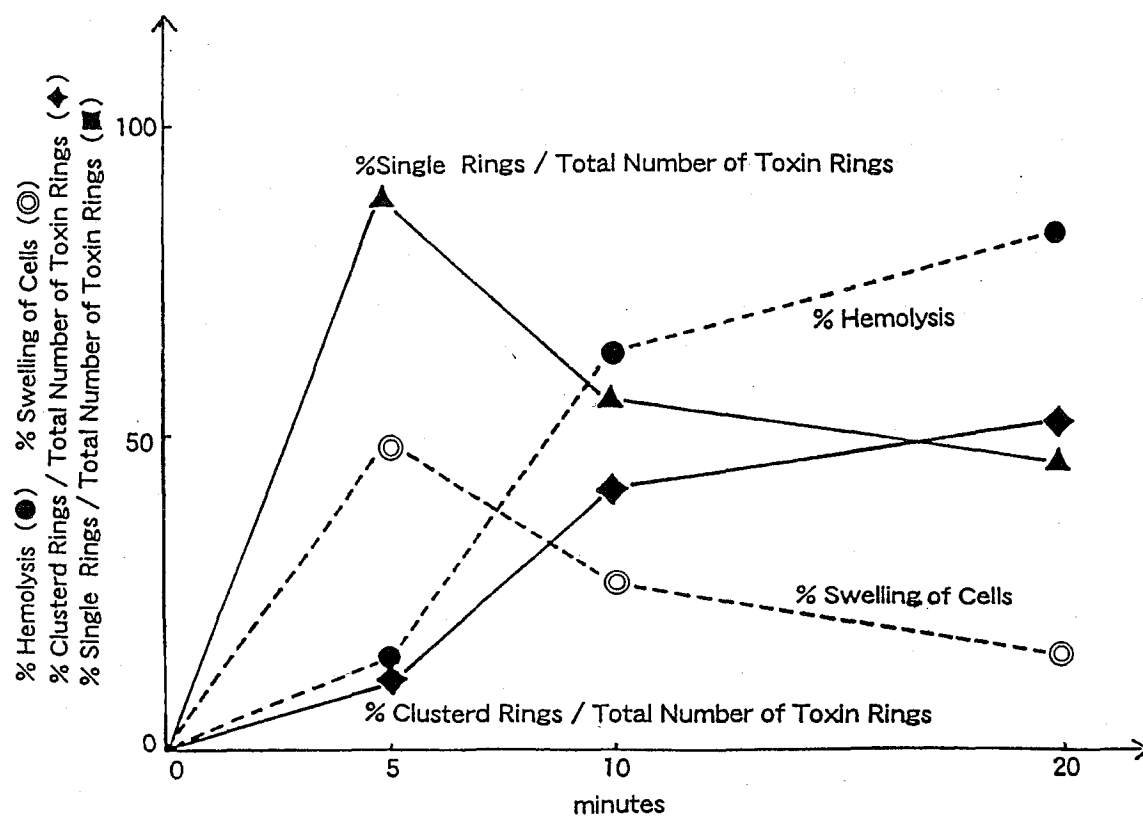


図11 赤血球膜上に形成された全リング数に占めるシングルリングの割合及びクラスター構成リング数の割合と溶血及び膨潤活性との比較



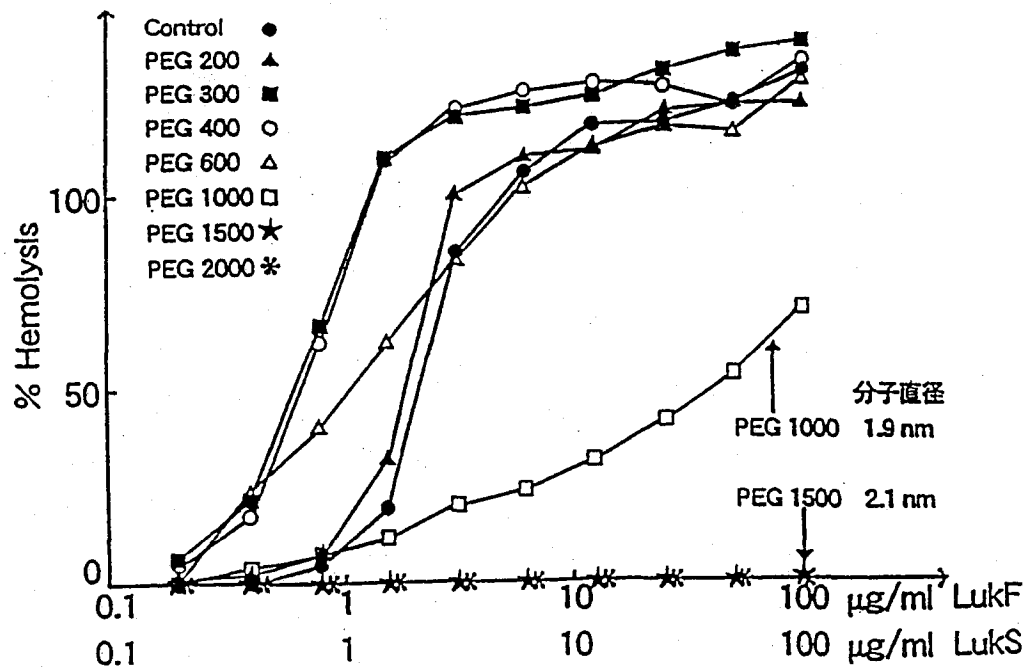


図12 各種ポリエチレングリコール存在下でのロイコシジンによるウサギ赤血球に対する溶血活性の測定

PEG 1000 存在下ではわずかに活性が検出されたが、PEG 1500 存在下では活性が完全に阻害された。

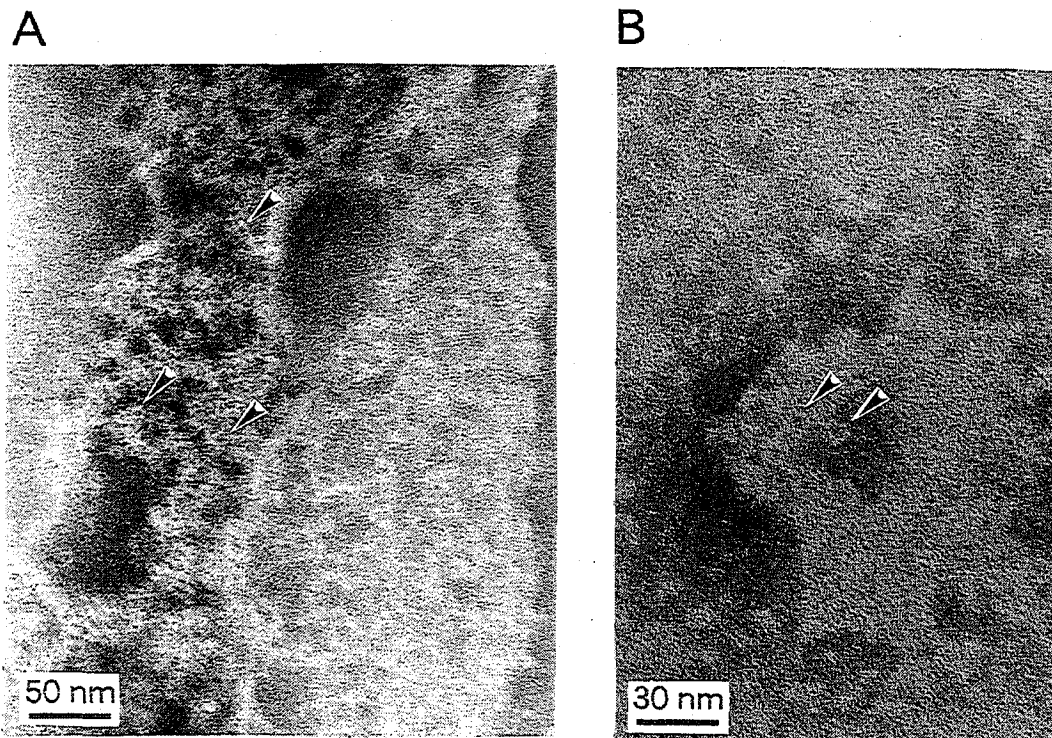


図13 ロイコシジンを作用させた標的細胞膜の透過型電子顕微鏡写真

A. ウサギ赤血球膜 B. ヒト多形核白血球細胞膜

A、B いずれにおいても内径約 3 nm、外径約 9 nm のリング状構造体（矢印）が観察された。

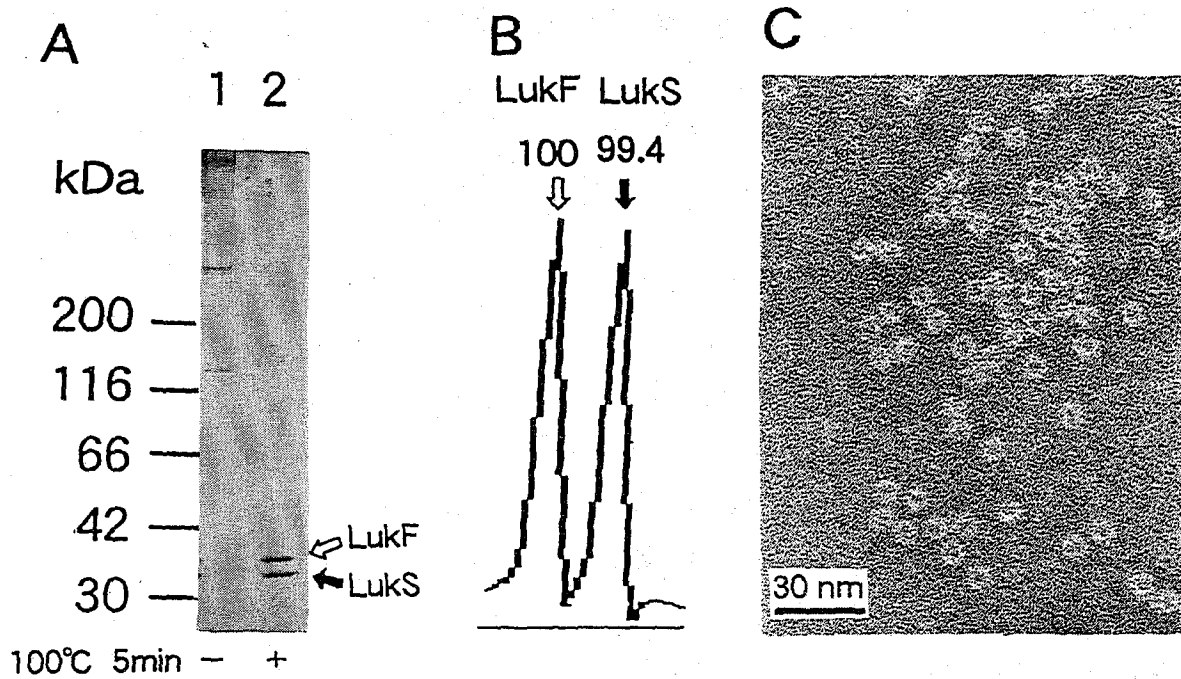


図14 ロイコシジンを用いたウサギ赤血球膜からリング状構造体の単離  
 A. SDS-PAGE による解析  
 B. A-Lane 2 のデンストメーター（数値は面積比）  
 C. 単離したリング状構造体の電子顕微鏡写真

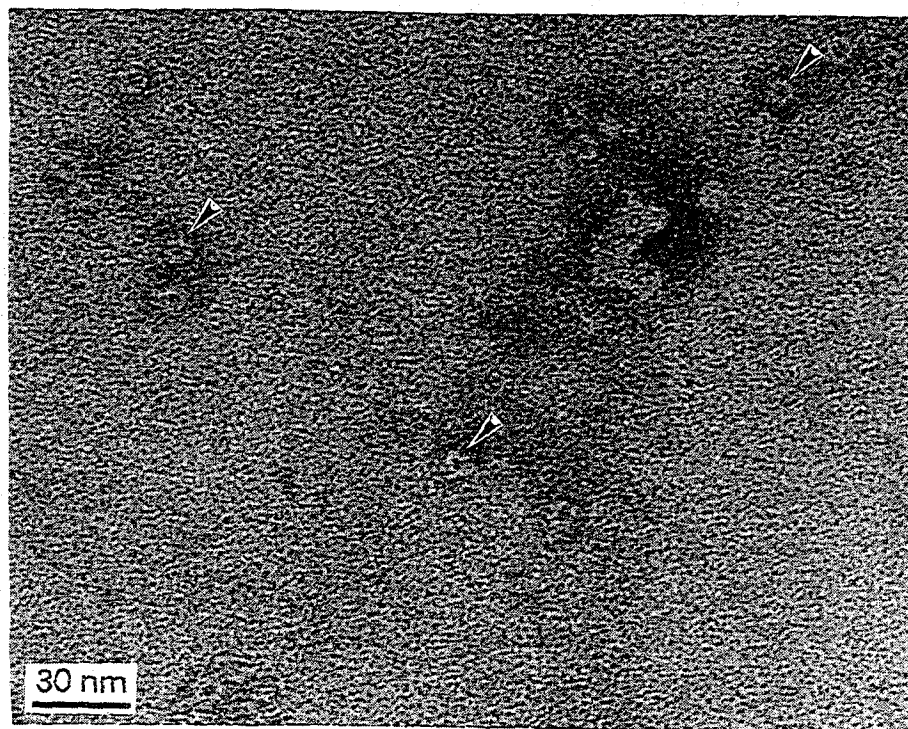


図15 ロイコシジンを用いたヒト多形核白血球から単離したリング状構造体

## 論文審査結果要旨

病原細菌の細胞崩壊毒素の多くは細胞膜に穴を開けて細胞崩壊を誘導する膜孔形成毒素である。膜孔形成毒素は、水溶性タンパク質として分泌されるが、標的細胞に結合すると大きく分子構造を変化して細胞膜へ入り込み、自己集合して毒素超チャネルを形成する。しかし、毒素超チャネル形成機構の全貌、特に毒素分子の集合の仕組みは不明である。本研究者の所属する研究室において、黄色ブドウ球菌の2成分性血球崩壊毒素成分の遺伝子のクローン化に成功して毒素による血球崩壊機構を分子レベルで究明できることを可能にしてきた。そして、ガンマヘモリジン並びにロイコシジンはそれぞれLukFとHlg2, LukFとLukSからなり、LukFを共通成分とする二成分毒素であることを明らかにしてきた。このような背景から本研究者は、上記毒素の標的細胞における分子の実体並びに血球崩壊機構を明らかにした。

本審査論文において本研究者は、以下の事実を明らかにした。(1)ガンマヘモリジン並びにロイコシジンが膜孔 (membrane pore) 形成毒素であること、(2)種々の大きさのポリエチレングリコール存在下での膜孔の実効内径の測定結果、本毒素は赤血球膜に内径2.1-2.4nmの膜孔を形成すること、(3)赤血球膜から膜孔を分離して電子顕微鏡及び生化学的手法を用いて解析した結果、膜孔は外径9 nm, 内径3 nmのリング状構造体であり、LukFとHlg2をモル比1:1で含有していること、(4)免疫沈降実験の結果から、膜孔複合体は両成分を含有するヘテロオリゴマーであること、(5)高精細のネガティブ染色電子顕微鏡像から、膜孔複合体は7個のモノマー分子から構成されていること、(6)グルタルアルデヒドにより隣接するモノマー分子間を部分架橋した後SDS存在下で100℃ 5分間の熱処理を行い、生成したダイマー画分の組成を分析した結果、ダイマーの大部分はLukF-Hlg2から成り、LukF-LukF及びHlg2-Hlg2が部分的に存在すること、(7)毒素超チャネルは2成分が交互に配置しているヘテロヘプタマー構造をとり、その中の成分比は3:4または4:3であること、(8)さらにヘテロヘプタマー毒素複合体は赤血球膜上でクラスター化し溶血を促進するが、本複合体形成並びにクラスター化は10℃以下では起きにくいこと、等を明らかにした。さらに本研究者は、ロイコシジンの形成する膜孔の分子の実体の解明を目指した。その結果、ロイコシジンの2成分LukFおよびLukSが、ヒト白血球及びウサギ赤血球膜上で内径3 nm, 外径9 nmのリング状の毒素複合体を形成すること、そして、本リング状毒素複合体は、実行内径1.9-2.1nmの膜孔として作動することを明らかにした。

以上のように本研究は、黄色ブドウ球菌のガンマヘモリジン並びにロイコシジンの2成分が標的細胞膜上で集合してリング状構造の7量体から成るヘテロヘプタマーを形成し、この毒素複合体が内径約2 nmの膜孔として作動して標的細胞の崩壊を引き起こす超チャネルの本体である事実を明らかにしたものであり、審査員一同は本研究者に博士(農学)の学位を授与するに値するものと認定した。